

ВПЛИВ ПРОДУКТІВ ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ *SACCHAROMYCES BOULARDII* НА УМОВНО-ПАТОГЕННІ ГРИБИ

Бончужна М.В., Мажак К.Д., Платонова І.Л.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького,
м. Львів, Україна

Анотація. Досліджено пробіотичну дію клітин та продуктів життєдіяльності *Saccharomyces boulardii* до умовно-патогенних грибів *Candida albicans*, виділених за дисбактеріозу кишечника. Визначено максимальну пробіотичну активність культурального субстрату *Saccharomyces boulardii* на етапі культивування штаму упродовж 3–5 діб. За результатами досліджень встановлено, що додавання супернатантів, отриманих після трьох діб культивування пробіотичних дріжджів *Saccharomyces boulardii* зменшило здатність клітин *Candida albicans* до адгезії на 22,5 %, після трьох діб культивування на – 75 %, після чотирьох діб та п'яти діб – на 12,5 % у порівнянні з контролем.

Ключові слова: дисбактеріоз кишечника, *Saccharomyces boulardii*, *Candida albicans*, культуральний субстрат, пробіотична дія, адгезія.

Вступ. Широке застосування антибіотиків в останні роки стало причиною зростання кількості захворювань на дисбіоз кишечника [1]. Вони характеризуються порушенням кишкової мікробіоти, зниженням концентрації коротколанцюгових жирних кислот у кишечнику, накопиченням люмінальних вуглеводів і жовчних кислот у товстій кишці та зміною всмоктування води [2]. Наслідки зміни динамічної рівноваги автохтонної мікробіоти кишечника впливають на низку органів та систем, включаючи психоемоційну сферу, серцево-судинну систему, шкіру, ендокринні органи, а також імунітет [1].

Найбільш вивченим профілактичним заходом при кишкових порушеннях, що розвиваються на фоні антибіотикотерапії, є призначення пробіотиків [3]. Відомо, що пробіотичні препарати, на основі дріжджових клітин володіють певною перевагою над бактерійними пробіотиками. Серед яких можна виділити, такі як стійкість до антибіотиків, здатність розвиватися при температурах до 37 °C та витримувати значення pH шлунку (1,5–2,5) [4]. Представники роду *Saccharomyces*, а саме *Saccharomyces boulardii* – єдині пробіотичні дріжджі, які отримали схвалення США

з контролю за продуктами харчування та ліками, як харчова добавка. *Saccharomyces boulardii* ATCC-MYA-796 зазвичай використовується в ліофілізованій формі [5].

За останній час на противагу пробіотиками, в центрі уваги науковців все частіше опиняються нові препарати – постбіотики (побічні продукти пробіотиків, які харчуються пребіотиками). «Постбіотик» був визначений, як «препарат неживих мікроорганізмів та / або їх компонентів, який приносить користь здоров'ю господаря» [6]. Пробиотики утворюють різні сполуки в результаті ферментації пребіотиків, які вважаються постбіотиками. Коротколанцюгові жирні кислоти, функціональні білки та позаклітинні полісахариди включають лише три приклади того, що можна описати як постбіотики. Завдяки функціональним біологічно активним сполукам, які містять постбіотики, здійснюється прямий позитивний вплив на імунну систему. Дослідженнями останніх років підтверджено, що такі захворювання, як atopічний дерматит, діарея та дитячі кольки полегшуються постбіотиками. Також їх можна використовувати здоровим людям для покращення загального самопочуття. Важливим є те, що постбіотики імітують функції та діяльність пробіотиків і не вимагають суворих умов виробництва чи зберігання [7].

Мета дослідження. Визначити антагоністичні та антиадгезивні властивості продуктів життєдіяльності пробіотичного штаму дріжджів *Saccharomyces boulardii* проти ізолятів умовно-патогенних грибів, виділених за дисбактеріозу кишечника.

Матеріали та методи досліджень. Як продуценти метаболітів використовували дріжджі *Saccharomyces boulardii* з пробіотичного препарату «Ентерол». У роботі досліджено тест-штами *Candida albicans* виділених у 5 пацієнтів з дисбактеріозом кишечника. Клітинним субстратом були нативні еритроцити крові 28 донорів різних вікових груп, різної статі, резус-позитивних і резус-негативних за системою АВО крові.

Отримання продуктів життєдіяльності. З добової культури сахароміцетів готували суспензії 10^9 КУО/мл за стандартом мутності та здійснювали інокуляцію в 1% цукровий бульйон у співвідношенні 1:9. Отримані суспензії інкубували упродовж 72, 96 та 120 годин за температури 37 °C [8]. Після інкубації, бульйонні культури центрифугували при 1500 об./хв впродовж 30 хв.

Дослідження антиадгезивних властивостей проводили наступним чином: в експериментальні проби до 1,0 мл суспензії еритроцитів додавали 1,25 мл речовини, яка містила стандартну суспензію грибів (10^9 КУО/мл за стандартом мутності) та супернатант сахароміцетів

у співвідношенні 1:9. Як контроль використовували проби, що містили 1,0 мл суспензії еритроцитів і 1,25 мл стандартної суспензії грибів (10^9 КУО/мл).

Проби інкубували за температури 37 °С упродовж 30 хв з періодичним струшуванням. Після цього еритроцити осаджували шляхом центрифугування за 1000 об./хв упродовж 1 хв [9]. Пізніше з проб відбирали супернатант в об'ємі 100 мкл і розводили в 0,9 % розчині натрій хлориду у співвідношенні 1:99. Отриману суспензію висівали в об'ємі 25 мкл на агаризоване середовище Сабуро.

З осаду клітин готували мазки і фарбували за Романовським-Гімза. Фіксууючу активність еритроцитів у співвідношенні зі штамами оцінювали за формулою:

$$ПА = \frac{Дк - ДДП}{Дк} \times 100 \%,$$

де $ПА$ – показник адгезії;

$ДК$ – концентрація КУО в контрольній пробі;

$ДДП$ – концентрація КУО в дослідній пробі.

На 100 еритроцитах визначали індекс адгезії (ІА) – кількість прикріплених мікроорганізмів на одному еритроциті, який обчислювали за формулою:

$$ІАМ = СПА \times 100 / K,$$

де $СПА$ – середня кількість бактерій, що прикріпилися до одного еритроцита за підрахунок не менше, як 25 еритроцитів;

K – відсоток еритроцитів, що мають на своїй поверхні адгезовані клітини бактерій [9].

Ступінь чутливості умовно-патогенних грибів до продуктів життєдіяльності пробіотичного штаму дріжджів визначали диско-дифузійним методом [10]. Стерильні «пусті» диски обробляли супернатантом (100 мкл/диск), отриманим після культивування дріжджів упродовж 96 годин в 1 % розчині цукрового бульйону. Після цього диски витримували до повного висихання та поміщали по 3 на чашку Петрі.

Дослідження проводили у три етапи. Під час першого етапу досліджено адгезивні властивості умовно-патогенних грибів *Candida albicans*, та їх пригнічення пробіотичними дріжджами *Saccharomyces boulardii*. В ході проведення другого етапу було визначено антиадгезивні властивості продуктів життєдіяльності (супернатанту), пробіотичного штаму дріжджів *Saccharomyces boulardii*, стосовно грибів *Candida albicans*, виділених за дисбактеріозу кишечника. На першому та другому етапах вибірка

налічувала 28 експериментальних та 28 контрольних досліджень. На третьому етапі досліджено антагоністичні властивості продуктів життєдіяльності, отриманих після культивування *Saccharomyces boulardii* упродовж 96-ти годинного культивування.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили прямим підрахунком клітин умовно-патогенних грибів.

Дослідження виконані з дотриманням положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (2000) і рекомендацій Комітету з біоетики при Президії АМН України за інформованої згоди пацієнтів на використання біологічного матеріалу, відібраного під час проведення замовних тестувань.

Результати та їх обговорення. Результати проведених досліджень на першому етапі підтвердили, що гриби *Candida albicans* є середньоадгезивними – рівень адгезії дорівнював 2,72 (рис. 1).

Пробіотичні дріжджі *Saccharomyces boulardii* зменшують рівень адгезії *Candida albicans* (рис. 2). Найвищі показники адгезії (41–50) спостерігали у контрольних дослідженнях, що дорівнює 15 % від загальної вибірки; найнижчий показник – 0–10 (5 % від загальної кількості). Найчастіше показник адгезії становив 31–40 (у 35 % від загальної кількості).

У експериментальних дослідженнях *Candida albicans* характеризувалась значно нижчими адгезивними властивостями. Так, у експериментальних

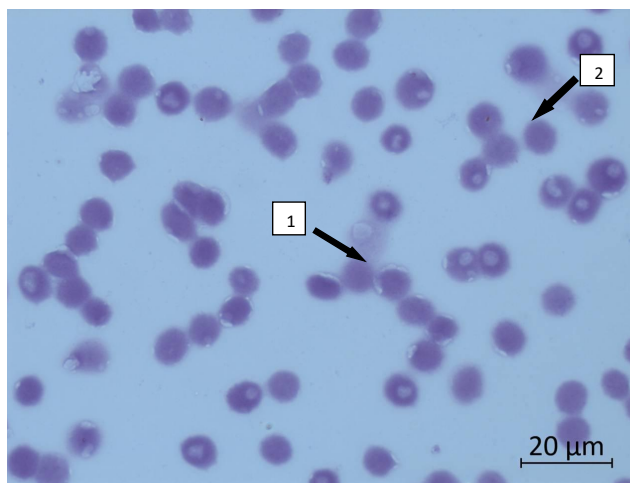


Рис. 1. Адгезивність грибів *Candida albicans* на еритроцитах крові:
1 – клітини *Candida albicans* на еритроцитах людини;
2 – еритроцити людини

дослідженнях найвищий показник адгезії дорівнював 31–40 (10 % від загальної кількості), а найнижчий – 0–10 (25 % від загальної кількості). Під час проведення другого етапу дослідження з'ясовано, що супернатанти, отримані після культивування *Saccharomyces boulardii* упродовж 72-ох, 96-ти та 120-ти годин, по різному впливають на адгезивність *Candida albicans* (рис. 3). Найвищі показники адгезії *Candida albicans* спостерігали після додавання супернатантів, отриманих після культивування *Saccharomyces boulardii* упродовж 120-ти годин, які сягнули позначки 41–50 (25 % від загальної кількості), найнижчий показник спостерігався найчастіше (75 % від загальної кількості) та дорівнював 31–40. Дещо нижчими були показники адгезії після додавання супернатантів, отриманих після культивування *Saccharomyces boulardii* упродовж 72-ох годин: найвищий показник – 41–50 (5 % від загальної кількості); найнижчий – 21–30 (65 % від загальної кількості).

Найнижчими показники адгезії клітин грибів були під час додавання продуктів життєдіяльності *Saccharomyces boulardii* після 96-ти годинного культивування: найчастіше показник адгезії становив 11–20 (30 % від загальної кількості), найвищий дорівнював 41–50 (5 % від загальної кількості), найнижчий 0–10 (25 % від загальної кількості).

Порівнявши показники адгезії *Candida albicans* після додавання суспензії клітин *Saccharomyces boulardii*, отриманих на першому етапі досліджень та після додавання супернатантів після 96-ти годинного культивування *Saccharomyces boulardii* суттєвої різниці не виявлено (рис. 4).

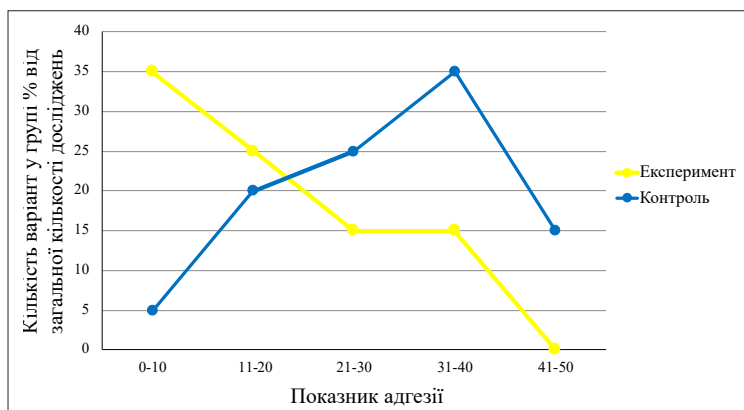


Рис. 2. Адгезивна активність грибів *Candida albicans*, виділених за дисбактеріозу кишечника

Пригнічення адгезивних властивостей тест-культури продуктами життєдіяльності *Saccharomyces boulardii* спостерігали упродовж усього етапу дослідження. Додавання супернатантів, отриманих після культивування *Saccharomyces boulardii* зменшило здатність клітин *Candida albicans* до адгезії на 22,5 % (72 години культивування), 75 % (96 годин) та 12,5 % (120 годин) у порівнянні з контролем. У ході проведення третього етапу дослідження, встановлено, що продукти життєдіяльності, отримані після культивування *Saccharomyces boulardii* упродовж 96-ти годинного культивування, володіють антагоністичними властивостями та гальмують ріст *Candida albicans* (рис. 5). Зони затримки росту становили 9,0+0,34 мм.

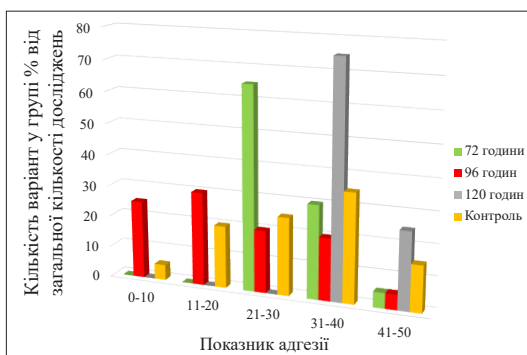


Рис. 3. Адгезивна активність грибів *Candida albicans*, виділених за дисбактеріозу кишечника, після додавання супернатантів, отриманих після культивування *Saccharomyces boulardii* упродовж 72, 96 та 120 годин

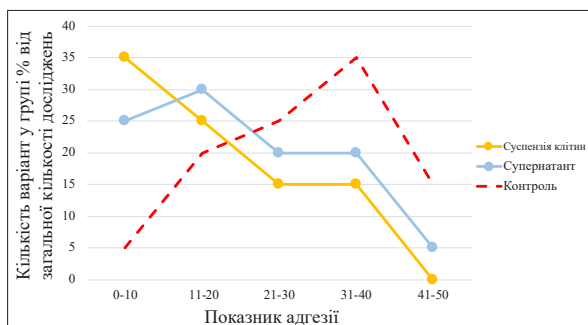


Рис. 4. Адгезивна активність *Candida albicans*, виділених за дисбактеріозу кишечника, після додавання суспензії клітин *Saccharomyces boulardii* та супернатантів, отриманих після культивування *Saccharomyces boulardii* упродовж 96-ти годин

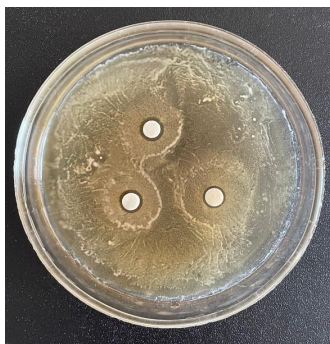


Рис. 5. Антагоністична активність супернатанту, отриманого після культивування *Saccharomyces boulardii* упродовж 96 годин, щодо *Candida albicans*

Висновки та перспективи.

1. Продукти життєдіяльності, отримані після культивування *Saccharomyces boulardii* упродовж 72-ох, 96-ти та 120-ти по різному впливають на адгезивність *Candida albicans*. Найнижчою виявилась адгезивна активність *Candida albicans* після додавання супернатанту, отриманого після 96-ти годинного культивування дріжджів; найвищою – 120-ти годинного.

2. Метаболіти, отримані після 96-ти годинного культивування пробіотичного штаму дріжджів *Saccharomyces boulardii*, володіють вираженими антагоністичними властивостями щодо *Candida albicans*.

Отримані результати, щодо пробіотичних властивостей продуктів життєдіяльності *Saccharomyces boulardii* стосовно *Candida albicans*, можуть слугувати підґрунтям для створення нової лікарської форми пробіотичного засобу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. Анохіна Г.А. Антибіотик-асоційована діарея: особливості вибору пробіотика, доза та тривалість лікування. *Український терапевтичний журнал*. 2020. № 1. С. 62–66. DOI: 10.30978/UTJ2020-1-62
2. Mekonnen S.A., Merenstein D., Fraser C.M., Marco M.L. Molecular mechanisms of probiotic prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Current opinion in biotechnology*. 2020. Vol. 61. P. 226–234. DOI: 10.1016/j.copbio.2020.01.005
3. Lukasik J., Dierikx T., Besseling-van der Vaart I., Meij T., Szajewska H. Multispecies probiotic for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *Journal of the American Medical Association pediatrics*. 2022. Vol. 176. № 9. P. 860–866. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2022.1973

4. Puri A.S. The role of yeast probiotics in gastrointestinal conditions: an overview. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 2023. Vol. 71. № 4. P. 11–12. DOI: 10.5005/japi-11001-0235
5. Старовойтова С.О., Скроцька О.І., Пенчук Ю.М., Дорошко Ю.М. Технологічні аспекти одержання пробіотиків. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*. 2014. Т. 20. № 4. С. 69–77.
6. Vinderola G., Sanders M.E., Salminen S. The Concept of Postbiotics. *Foods*. 2022. Vol. 11. № 8. 10 p. DOI: 10.3390/foods11081077
7. Bourebabaa Y., Maryczb K., Mularczyk M., Bourebaba L. Postbiotics as potential new therapeutic agents for metabolic disorders management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022. № 153. 15 p. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113138
8. Ісаєнко О.Ю., Книш О.В., Бабич Є.М., Зачепило С.В., Савінова О.М. та інші. Протимікробна активність продуктів метаболізму *Saccharomyces boulardii* відносно тест-культур стафілококів і коринебактерій. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2017. Т. 3. № 54. С. 50–55.
9. Гужвинська С.О., Палій А.П. Визначення антагоністичних та адгезивних властивостей лактобактерій та біфідобактерій. *Мікробіол. журн*. 2018. Т. 80. № 1. С. 36–44. DOI: 10.15407/microbiolj80.01.036
10. Наказ МОЗ України від 05.04.2007 № 167 «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» [Електронний ресурс]. 2007. URL: https://zakononline.com.ua/documents/show/95792__95792.

REFERENCES:

1. Anokhina GA. Antibiotic-associated diarrhea: peculiarities of the probiotic choice, dose and duration of treatment. *Ukr Therap J*. 2020 Jan;1:62–66. DOI: 10.30978/UTJ2020-1-62
2. Mekonnen SA., Merenstein D., Fraser CM., Marco ML. Molecular mechanisms of probiotic prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Curr Opin Biotechnol*. 2020 Feb; 61: 226–234. DOI: 10.1016/j.copbio.2020.01.005
3. Lukasik J., Dierikx T., Besseling-van der Vaart I., Meij T., Szajewska H. Multispecies probiotic for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *Journal of the American Medical Association pediatrics*. 2022 Sep; 176 (9): 860–866. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2022.1973
4. Puri AS. The role of yeast probiotics in gastrointestinal conditions: an overview. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 2023 Apr; 71(4): 11–12. DOI: 10.5005/japi-11001-0235
5. Starovoytova S., Skrotskay O., Penchuk Yu., Doroshko Yu. Technological aspects of preparing probiotics. *National University of Food Technologies*. 2014 Aug; 20(4): 69–77.

6. Vinderola G., Sanders ME., Salminen S. The Concept of Postbiotics. *Foods*. 2022 Apr 8; 11 (8): 1077. DOI: 10.3390/foods11081077
7. Bourebabaa Y., Maryczb K., Mularczyk M., Bourebaba L. Postbiotics as potential new therapeutic agents for metabolic disorders management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 Sep; 153: 113138. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113138
8. Isayenko OYu., Knysh OV., Babych EM., Zachepyllo SV., Savinova SV., Naboychenko OA. Antimicrobial activity of metabolites of *Saccharomyces boulardii* against test cultures of *Staphylococci* and *Corynebacteria*. *Pharmacology and medicinal toxicology*. 2017 May; 3(54): 50–55.
9. Gujvinska SO., Paliy AP. Determination of antagonistic and adhesive properties of lactobacterium and bifidobacterium. *Microbiol. journal*. 2017; 80(1): 36–44. DOI: 10.15407/microbiolj80.01.036
10. Order of the Ministry of Health of Ukraine dated April 5, 2007 № 167 “Determining the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs” [Electronic resource]; 2007 Apr 5. URL: https://zakononline.com.ua/documents/show/95792___95792.

THE INFLUENCE OF *SACCHAROMYCES BOULARDII* PRODUCTS ON CONDITIONAL PATHOGENIC FUNGI

Bonchuzhna M., Mazhak K., Platonova I.

Abstract. *The probiotic effect of cells and waste products of Saccharomyces boulardii on opportunistic fungi Candida albicans isolated for intestinal dysbacteriosis was studied. The maximum probiotic activity of the Saccharomyces boulardii culture substrate at the stage of strain cultivation for 3–5 days was determined. According to the research results, it was established that the addition of supernatants obtained after three days of cultivation of the probiotic yeast Saccharomyces boulardii reduced the ability of Candida albicans cells to adhere by 22,5 %, after three days of cultivation by 75 %, after four days and five days by 12,5 % compared to the control.*

Key words: *intestinal dysbacteriosis, Saccharomyces boulardii, culture substrate, probiotic action, Candida albicans, adhesion.*

Бончужна М.В. +38(098)5518485, meri_m5@ukr.net

Мажак К.Д. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7776-8892>

Платонова І.І. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3171-5706>